

VU Research Portal

Tumor-derived apoptotic bleb vaccines for the treatment of Acute Myeloid Leukemia

Ruben, J.M.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Ruben, J. M. (2015). *Tumor-derived apoptotic bleb vaccines for the treatment of Acute Myeloid Leukemia*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

CHAPTER 8

Therapeutische vaccinatie met dendritische cellen (DC) is een veelbelovende experimentele therapie voor de behandeling van minimale residuale ziekte en kan mogelijk een recidief bij acute myeloïde leukemie (AML) voorkomen. Verschillende bronnen van leukemie-geassocieerd antigenen (LGA) en verschillende methoden voor het beladen van antigenen op DC zijn onderzocht en enkele getest in een klinische setting. Echter, tot op heden is het onduidelijk welke methode het meest optimaal is voor het bereiden van een vaccin. Dit proefschrift beschrijft de verschillende typen geteste DC vaccins en hoe deze vaccins mogelijk effectiever gemaakt kunnen worden voor de behandeling van AML.

Bewerking van:

Actieve immuuntherapie bij acute myeloïde leukemie

J.M. Ruben, W. van den Ancker, T.M. Westers, G.J. Ossenkoppele, T.D. de Gruijl en A.A. van de Loosdrecht

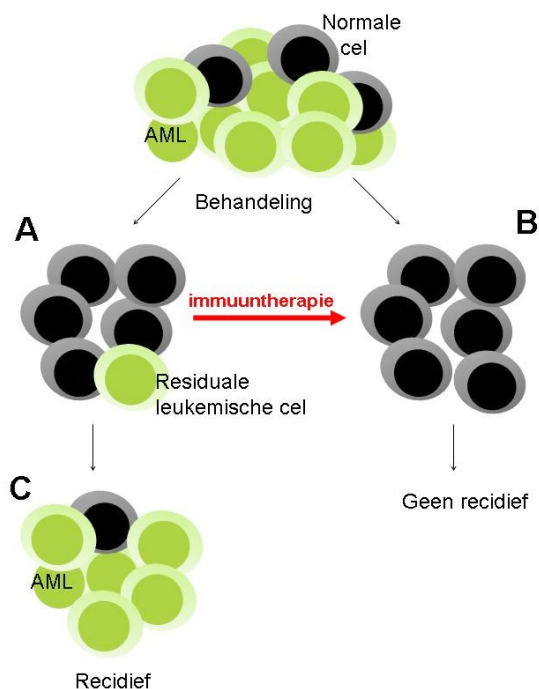
Nederlands Tijdschrift voor Hematologie, 2014

NEDERLANSE SAMENVATTING



INTRODUCTIE

Acute myeloïde leukemie (AML) is een maligniteit waarin de myeloïde voorloper cel transformeert naar een leukemische cel. Vanwege de infauste prognose is intensieve behandeling met chemotherapie noodzakelijk, veelal gevolgd door stamcel transplantatie. Ondanks intensieve therapie ontwikkelt 50 à 60% van de patiënten een recidief. Met behulp van flowcytometrie en moleculaire diagnostiek kunnen residuale AML cellen worden gedetecteerd die zeer laag frequent aanwezig zijn en kan steeds beter een recidief worden voorspeld ¹. Patiënten die een recidief doormaken hebben een slechte prognose ². Ontwikkeling van nieuwe therapieën is daarom noodzakelijk. Een optie is het activeren en manipuleren van het immuunsysteem om zodoende een immuunrespons op te wekken gericht tegen (residuale) tumorcellen en deze te elimineren en daarmee een recidief te voorkomen (figuur 1).



Figuur 1. Residuale ziekte en recidief na behandeling. Na diagnose worden AML patiënten behandeld door middel van intensieve chemotherapie, eventueel gevolgd door een stamcel transplantatie. Residuale leukemische cellen (A) kunnen na behandeling uitgroeien en een recidief van de leukemie veroorzaken (C), die zeer slecht te behandelen is. Indien alle leukemische cellen worden geëlimineerd na behandeling is een patiënt genezen en zal de ziekte niet terug keren (B). Met immunotherapie wordt getracht een immuunrespons op te wekken, gericht tegen residuale leukemische cellen, om zodoende een recidief te voorkomen.

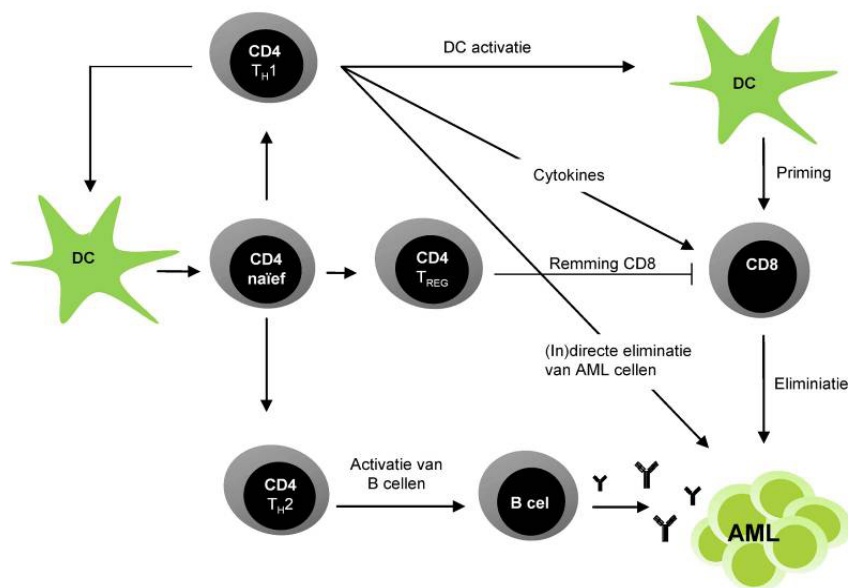
De rol van het immuunsysteem bij AML

Met de ontwikkeling van de allogene stamceltransplantatie werd ook het belang van het immuunsysteem benadrukt: het graft-versus-leukemie effect, waarbij het donor immuunsysteem de leukemie van de ontvanger aanvalt, speelt een belangrijke rol in het voorkomen van een recidief. In het geval van een recidief na een allogene stamceltransplantatie kan een complete remissie worden bewerkstelligd door het geven van een donor lymfocyten infusie (DLI). Activering van T-cellen door antigeen presenterende cellen (APC), zoals dendritische cellen (DC), speelt hierbij een centrale rol. DC zijn in staat om leukemische cellen, of delen hiervan, op te nemen, te verwerken en vervolgens peptiden afkomstig van de tumor antigenen in HLA-klasse I en II moleculen te presenteren aan de T-cel. Dit resulteert in activering en uitgroei van respectievelijk CD8⁺ cytotoxische T-cellen en CD4⁺ T-helper (T_H) cellen. Er zijn meerdere types T_H cellen: T_H2 cellen zijn betrokken bij de inductie van humorale immuniteit door het activeren van B-cellen en T_H1 cellen helpen bij activatie van cytotoxische CD8⁺ T-cellen (figuur 2). Daarnaast zijn er in het laatste decennium een aantal T_H subsets beschreven die genoemd zijn naar het voornaamste cytokine dat zij produceren, zoals T_H17 (interleukine 17) en T_H22 (interleukine 22). Naast een activerende T_H subset, bestaat er de regulatoire T-cel (T_{REG}) die in staat is T-cel responsen te onderdrukken.

Ook maligne cellen kunnen op verschillende manieren interfereren in de anti-tumor respons en ontsnappen daarbij aan herkenning en eliminatie door het immuunsysteem, ook wel “immune escape” genoemd. Tumorcellen presenteren bijvoorbeeld in plaats van tumor-geassocieerde antigenen (TGA) het peptide CLIP (het HLA-klasse II-geassocieerde Invariante keten-peptide) in het HLA-klasse II molecuul, wat interfereert met het activeren van anti-leukemie TH cellen³. Daarnaast zijn tumoren in sommige gevallen in staat de expressie van TGA, te verlagen⁴; AML cellen brengen bovendien eiwitten op het oppervlak tot expressie die T-cellen kunnen remmen via interacties met de checkpointmoleculen CTLA-4 en PD-1. De expressie van indolamine-2,3-dioxygenase in AML is geassocieerd met een slechtere klinische overleving, mogelijk veroorzaakt door sturing van de immuunrespons naar een immuun suppressieve staat⁵. Leukemische cellen kunnen daarnaast regulatoire cytokines uitscheiden zoals VEGF, IL-6, GM-CSF, IL-10 en TGFβ, waardoor een immuun suppressief micro-milieu wordt gecreëerd en de immuunrespons wordt beperkt⁶.

Passieve immuuntherapie

Immuuntherapie richt zich op het (passief, dan wel actief) inzetten van een immuunrespons tegen (residuale) kanker cellen. Met actieve immuuntherapie wordt bedoeld dat een effector en memory immuunrespons actief *in vivo* wordt geïnduceerd, zoals wordt bewerkstelligd met vaccinatie.



Figuur 2. Samenspel van lymfocyten en dendritische cellen. Dendritische cellen (DC) kunnen worden geactiveerd door pathogenen (in geval van infectie), door gedefinieerde stoffen, zoals cytokines of door specifieke onderdelen van pathogenen (in het geval van anti-tumor vaccinatie). Geactiveerde DC (ook wel mature DC genoemd) zijn in staat CD4⁺ T-helper cellen te activeren, welke ondersteuning bieden na de activatie van CD8⁺ T-cellen door DC. De naïeve CD4⁺ T-cel groeit uit tot een T-helper type 1 (T_H1) of T_H2 cel. De T_H1 cel vervult meerdere functies: deze cel 1. koppelt een activatie signaal terug aan de DC, welke verder wordt geactiveerd, 2. ondersteunt de activatie van CD8⁺ T-cellen en 3. helpt de CD8⁺ T-cel bij de eliminatie van AML cellen. Daarnaast is recent aangetoond dat T_H1 cellen ook in staat zijn de tumorcellen direct te liseren. De T_H2 cel produceert cytokines ter ondersteuning van de immuunrespons en helpt bij de activatie van B-cellen, zodat deze antilichamen kunnen gaan produceren. De antilichamen binden vervolgens aan de AML cellen en dienen als aangrijpingspunt voor andere cellen van het immuunsysteem om deze AML cellen op te ruimen. Daarnaast worden regulatoire T-cellen (T_{REG}) geactiveerd, welke de immuunrespons juist remmen.

Daarentegen wordt er bij passieve immuuntherapie geen effector en memory respons *in vivo* geïnduceerd, maar worden de effector cellen (bijvoorbeeld CD8⁺ T-cellen) of effectormoleculen (zoals antilichamen) direct toegediend als therapie. Een voorbeeld van passieve immuuntherapie is de toediening van TGA-specifieke T-cellen, die in het

laboratorium zijn gekweekt (adoptieve T-cel transfer). De werking van de behandeling zal niet langer zijn dan de levensduur van de T-cellen en ook deze T-cellen kunnen minder effectief worden als gevolg van regulatoire eigenschappen van tumoren. Wel kan het aantal TGA-specifieke T-cellen bij infusie gekozen worden en is de specificiteit bekend. Tevens kan deze vorm van therapie gunstig zijn wanneer de functionaliteit van het immuunsysteem van de patiënt verminderd is, zoals in het geval van een manifeste leukemie en tijdens en direct na chemotherapie. Tot dusver zijn er in beperkte mate TGA-specifieke T-cellen gebruikt voor passieve cellulaire immuuntherapie van patiënten⁷, maar er worden momenteel ook andere celtypen getest voor de behandeling van AML (voornamelijk Natural Killer cellen⁸). Een andere vorm van passieve immuuntherapie is behandeling met antilichamen, zoals het tegen het myeloïd-geassocieerde membraaneiwit CD33 en het tegen B-cel specifieke membraaneiwit CD20. De functie van antilichamen wordt bewerkstelligd door binding van het antigeen-herkende fragment (Fab) aan de tumorcel en vervolgens herkenning van het constante (Fc) deel van het antilichaam door fagocyten en door het complement systeem. Deze antilichamen kunnen eventueel worden geconjugeerd aan toxines, waardoor de effectiviteit veelal toeneemt (vooropgesteld dat het na binding door de tumorcel geïnternaliseerd wordt). Een nieuwe therapie die momenteel getest wordt is de toepassing van transgene chimere antigeen receptoren (CAR). Hierbij wordt het Fab fragment van een tumor-gerelateerd antilichaam gekoppeld aan het intracellulaire signaaltransductie complex geassocieerd met de T-cel receptor, waardoor T-cellen structurele oppervlaktemoleculen kunnen herkennen en elimineren buiten de normale HLA-restrictie, zoals recent in acute B lymfocytair leukemie patiënten met CD19-CAR is aangetoond⁹.

Actieve immuuntherapie

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op de zogenaamde actieve immuuntherapie, dat zich richt op het induceren van een effector immuunrespons *in vivo*, zoals een TGA-specifieke cytotoxische T-cel of B-cel respons. Daarbij wordt ook getracht een zogenaamde memory (geheugen) respons op te wekken. Memory cellen zijn langlevende cellen, die in staat zijn snel geactiveerd te worden en vervolgens te expanderen bij herhaald contact met hun specifiek herkende antigeen. Voor het genereren van dergelijke responsen is een goed functionerend immuunsysteem noodzakelijk. Actieve immuuntherapie wordt daarom bij voorkeur toegepast na chemotherapie en bij hematologisch herstel (zie verder). Er zijn verschillende manieren waarop actieve immuuntherapie bij kanker kan worden toegepast. De meest gebruikte zijn de cellulaire vaccins op basis van dendritische cellen (DC), zoals hieronder beschreven en samengevat in figuur 3.

Cellulaire vaccins: dendritische cellen beladen met tumor geassocieerde antigenen

DC zijn werkzaam op het grensgebied van de aangeboren en adaptieve immuniteit en zijn in staat om antigeen-specifieke immuunresponsen te initiëren. DC kunnen *in vitro* worden gekweekt uit CD14⁺ monocyten (MoDC) of CD34⁺ voorloper cellen. Om DC een antigeen-specifieke respons op te laten wekken, dienen ze te worden beladen met het gewenste antigeen (TGA). Voor AML zijn er een aantal TGA bekend, zoals PRAME, WT1, RHAMM. Het beladen van DC met korte, gekarakteriseerde peptiden (8-10 aminozuren) gebeurt volledig extracellulair; de peptiden binden direct aan de HLA-klasse I moleculen op het oppervlak van de DC (figuur 3A). Deze peptiden zijn fragmenten van een bekend TGA en dienen gekarakteriseerd te worden voor binding aan een specifiek HLA molecuul. Echter, de beschikbaarheid van deze peptiden op het oppervlak van de DC is relatief kort (< 24 uur). Daarom kan ook gekozen worden om de DC te beladen met de gehele (gelyseerde of apoptotische) tumor, waarbij alle TGA wordt beladen (figuur 3B). Hiertoe dient het eiwit eerst te worden opgenomen en intracellulair verwerkt door de DC, voordat het gepresenteerd kan worden aan T-cellen. Hierbij is er geen sprake van beperkingen ten aanzien van HLA-restrictie en blijft het antigeen gedurende een langere periode op het oppervlak van de DC gepresenteerd. Een ander optie is het elektroporeren van mRNA coderend voor TGA (figuur 3C), dat door de DC, na translatie in eiwit, gepresenteerd wordt aan T-cellen. Ook deze bron van TGA dient gekarakteriseerd te worden voor tumor specificiteit. Van mRNA getransleerde peptiden worden net als synthetische korte peptiden relatief kortdurend gepresenteerd, in vergelijking met de presentatie van epitopen afkomstig van gelyseerde of apoptotische tumor cellen na fagocytose.

Een nadeel van toepassing van zowel peptiden, eiwit(fragmenten), alsmede mRNA electroporatie, is dat er nog maar weinig leukemie-specifieke antigenen (LSA) bekend zijn. Daarnaast komen niet alle LSA tot expressie bij elke patiënt. Dit probleem kan omzeild worden door gebruik te maken van de leukemische cellen van de patiënt.

Cellulaire vaccins: dendritische cellen beladen met materiaal afkomstig van leukemiecellen

Door leukemische cellen van de patiënt als bron van antigeen te gebruiken worden naast bekende ook niet geïdentificeerde leukemische eiwitten geëxploiteerd en is de behandeling niet beperkt tot een specifiek HLA genotype of fenotype. In de klinische praktijk blijkt het hierbij toegenomen risico op auto-immuun fenomenen zeer beperkt en goed behandelbaar. Belading van antigenen afkomstig van leukemiecellen op DC is tot dusver op verschillende manieren uitgevoerd, zoals (1) elektroporatie van

totaal RNA van leukemische cellen in DC (figuur 3D), (2) het beladen van DC met lysaten van leukemische cellen (figuur 3E), (3) het beladen van DC met verschillende fracties van apoptotische leukemische cellen (figuur 3F&G), (4) het beladen van DC met geëluide peptiden van leukemische cellen (figuur 3H) en (5) het vormen van hybride cellen van DC en leukemische cellen of leukemische cellijnen (figuur 3I& J).

Onderzoek binnen ons instituut richt zich, naast het beladen van DC met tumorcel-lysaten¹⁰, ook op het beladen van DC met kleine cellulaire partikels afkomstig van apoptotische cellen, zogenaamde “blebs” (figuur 3F)¹¹. In **hoofdstuk 2** hebben wij aangetoond dat blebs in hogere mate door MoDC kunnen worden gefagocyteerd en dat deze MoDC vervolgens beter in zijn staat te migreren naar CCL19, een chemokine dat essentieel is voor de migratie naar secundair lymfatische organen. Daarnaast blijken MoDC een gunstige T_H1 “skewing” bij T-cellen te induceren en een sterkere LSA-specifieke immuunrespons op te wekken *in vitro*, vergeleken met DC beladen met de overblijvende apoptotische cellichamen (ACR).

In **hoofdstuk 3** hebben we verder onderzoek gedaan naar twee typen MoDC: de klassieke MoDC die gekweekt zijn in aanwezigheid van IL-4 en GM-CSF (IL-4 MoDC) en de IFN α MoDC, waarbij IL-4 wordt vervangen door IFN α . Uit onderzoek van anderen is namelijk gebleken dat IFN α MoDC beter in staat zijn exogeen antigeen te presenteren aan CD8⁺ T-cellen d.m.v. kruis-presentatie^{10,11}. Desondanks is er nog niet eerder een vergelijk gemaakt tussen IL-4 en IFN α MoDC met betrekking tot de gebruikelijk kweekmethoden en de bron van antigeen voor de belading. Uit het onderzoek beschreven in hoofdstuk 3, is gebleken dat IL-4 MoDC beter in staat zijn exogeen antigeen (apoptotische blebs) te fagocyteren en vervolgens CD8⁺ T-cellen te primen. IFN α MoDC waren daarentegen potenter in het kruis-presenteren van lange peptiden, zoals eerder beschreven^{10,11}. Deze data hebben consequenties voor toekomstige klinische studies, waarbij MoDC gebruikt worden om tumor-specifieke immuniteit te induceren. IL-4 MoDC blijken geschikt voor het beladen met cellulair materiaal (blebs), waar IFN α MoDC beter geschikt zijn voor het beladen met lange peptiden.

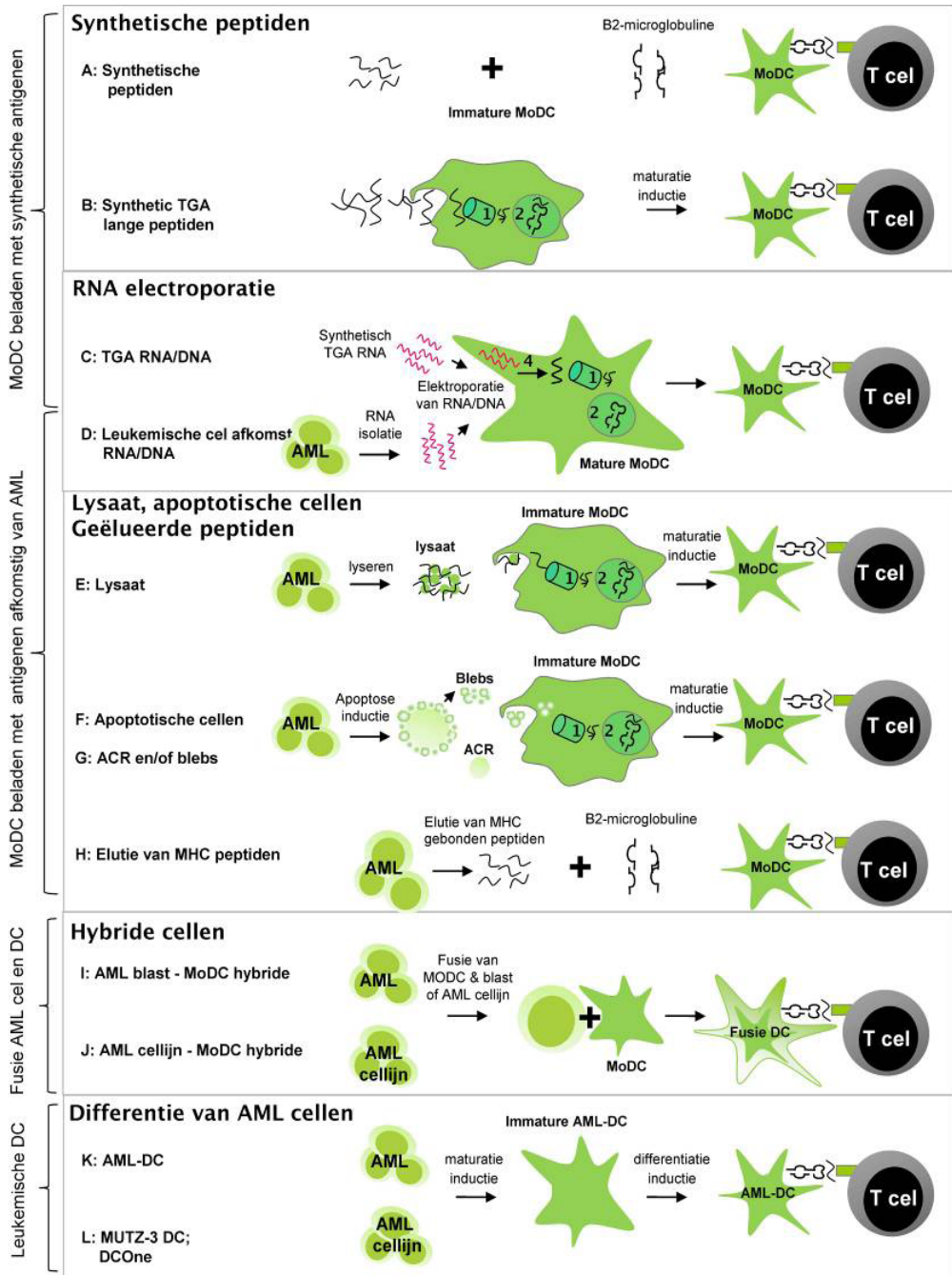
Cellulaire vaccins: leukemische dendritische cellen

In de jaren 70 werd voor het eerst een cellulair vaccin toegepast bij AML: een vaccin van bestraalde leukemiecellen gecombineerd met Baccillus Calmette-Guierin (BCG) om het immuunsysteem te activeren. Dit resulteerde in een langere overleving (545 t.o.v. 303 dagen)¹². Bij gebrek aan co-stimulatoire eiwitten en door andere immuunsuppressieve kenmerken zijn AML cellen slecht in staat om naïeve T-cellen te activeren en een immuunrespons te genereren. Echter, onder invloed van cytokines kunnen AML

cellen, die voldoen aan bepaalde functionele en fenotypische eigenschappen, worden gedifferentieerd tot een DC (figuur 3I)¹³. Deze zogenaamde AML-DC brengen co-stimulatoire en andere belangrijke eiwitten tot expressie en zijn daardoor beter in staat om T-cellen te activeren dan normale leukemische cellen. Op deze manier kan er een persoonlijk vaccin worden bereid, overeenkomend met de TGA samenstelling van de leukemiecellen van de patiënt. In de praktijk blijkt echter, dat het differentiëren van AML cellen naar een AML-DC niet altijd mogelijk is en de bereiding zeer tijdrovend. Een andere oplossing is het gebruik van een gestandaardiseerd vaccin op basis van een AML cellijn, wat vergelijkbare voordelen heeft als een AML-DC (figuur 3J). Een voorbeeld van een dergelijk vaccin is DCOne (ontwikkeld door DCPrime BV, Leiden). DCOne heeft het haplotype HLA-A2/A3* en is daardoor geschikt voor gedeeltelijk HLA-gematchte vaccinatie in ongeveer 70% van Kaukasische bevolking. In een onlangs uitgevoerde fase 1 klinische studie werd dit vaccin in het VU Medisch Centrum, in samenwerking met DCPrime, getest. DCOne wordt in het laboratorium onder GMP condities geprepareerd en bleek veilig te kunnen worden toegediend aan AML patiënten, resulterend in TGA-specifieke immuunresponsen (manuscript in voorbereiding). Momenteel wordt een fase II studie met DCOne voorbereid.

Een AML cellijn die binnen ons instituut veel gebruikt wordt voor onderzoeksdoeleinden is de MUTZ-3 cellijn¹⁴. Deze cellijn kan worden gebruikt om een cel te kweken met de fenotypische en functionele eigenschappen van een DC. Deze zogenaamde MUTZ-DC worden gekweekt in aanwezigheid van IL-4 en GM-CSF, vergelijkbaar met MoDC. Daarnaast hebben we een protocol beschreven waarmee DC in 3 dagen gekweekt kunnen worden door mitoxantrone toe te voegen aan het kweekprotocol¹⁵.

Figuur 3. Overzicht van verschillende tumor antigeen bronnen en strategieën om DC te beladen. Mature, uit monocytën verkregen DC (MoDC), kunnen direct beladen worden met synthetisch peptide in combinatie met beta-2-microglobuline (**A**). Lange peptides (**B**) moeten daarentegen door de DC worden opgenomen, verwerkt door het proteasoom (1) en vervolgens beladen op MHC klasse I moleculen (2) waarna het HLA:peptide complex wordt getransporteerd naar het celoppervlak. In **C** en **D** wordt electroporatie van RNA of DNA weergegeven van tumor geassocieerde eiwitten (TGA) of totaal RNA/DNA verkregen van de leukemische cel. Het DNA/RNA wordt na translatie tot eiwit (4) afgebroken door het proteasoom (1) en vervolgens beladen op het MHC klasse I molecuul (2). In **E**, **F** en **G** worden respectievelijk lysaten en verschillende apoptotische cel fracties (blebs en apoptotische cel restanten ACR) beladen op immature DC, waarna maturatie wordt geïnduceerd. MoDC kunnen ook direct worden beladen met geëluëerde peptiden van leukemische cellen (**H**). Daarnaast kunnen AML cellen (**I**) of AML cellijnen (**J**) met MoDC worden gefuseerd. Ook kunnen AML cellen (**I**) of AML cellijnen zoals MUTZ-3 of DCOne (**J**) tot DC (AML-DC) worden gedifferentieerd met behulp van cytokine cocktails.



Echter, nog niet eerder is beschreven of MUTZ-3 ook onder invloed van IFN α en GM-CSF kan worden gedifferentieerd naar een IFN α MUTZ-DC. Om dit te onderzoeken hebben we in **hoofdstuk 4** IL-4 en IFN α MUTZ-DC vergeleken. Uit dit onderzoek is gebleken dat IFN α MUTZ-DC typische DC eigenschappen adopteren. IFN α MUTZ-DC hebben bijvoorbeeld een typisch DC fenotype en zijn bovendien in staat antigeen te fagocyteren, te migreren en antigeen-specifieke CD8⁺ T cel responsen te induceren. De MUTZ-3 cellijn blijkt daarmee geschikt als model te dienen om IFN α -geïnduceerde DC differentiatie nader te onderzoeken.

Het beladen van DC *in vivo*

In plaats van het genereren van AML-DC, of het beladen van DC *in vitro*, kan er ook worden gekozen om de belading *in vivo* plaats te laten vinden en alleen de antigeenbron (eventueel gecombineerd met een adjuvant) als vaccin aan te bieden. Hierbij is een efficiënte opname van het antigeen door DC *in situ* van belang. Een voorbeeld hiervan is vaccinatie met langere peptiden van reeds bekende TGA. Door het koppelen van TGA aan antilichamen of introductie van TGA-coderende genen in recombinant aangepaste virale vectoren die gericht zijn tegen DC geassocieerde target moleculen, zoals DEC205¹⁶, DC-SIGN¹⁷ en CD40¹⁸ kunnen TGA specifiek naar de DC worden gedirigeerd. Ook hier speelt echter dat de antigenen al bekend moeten zijn en de (nog) onbekende LSA onbenut blijven. Voor de *in vivo* belading van DC kan ook materiaal van de leukemische cel gebruikt worden als bron van TGA. Zo kunnen lysaten en apoptotische cel fracties direct (veelal intradermaal) worden toegediend en mogelijk opgenomen worden door migrerende DC populaties. Om te onderzoeken of apoptotische cel fracties na intradermale injectie daadwerkelijk opgenomen worden door huid DC en of het verkregen antigeen wordt gepresenteerd aan CD8⁺ T-cellen, hebben we in **hoofdstuk 5** gebruik gemaakt van een humaan huidmodel, waarin we ACR of blebs intradermaal hebben geïnjecteerd. Dit onderzoek heeft aangetoond dat alle bekende huid DC populaties in staat bleken apoptotisch materiaal op te nemen. Echter, na toediening van IL-4 en GM-CSF (een activerend cytokine-cocktail voor huid DC) werden blebs in sterk verhoogde mate gefagocyteerd door CD1a⁺CD14⁺ dermale DC (DDC), die het best in staat zijn T-cellen te activeren¹⁹⁻²¹. Onze data hebben tevens aangetoond dat er na injectie van blebs antigeen kruis-presentatie aan tumor-specifieke CD8⁺ T-cellen plaatsvindt. In combinatie met de studie beschreven in hoofdstuk 2, hebben wij zo aangetoond dat blebs de meest potente bron van LSA is wanneer een apoptotisch celpreparaat gebruikt wordt als tumorvaccin. Om opname en DC maturatie verder te bevorderen en om verschillende immuuncellen naar de locatie van injectie te dirigeren, kunnen er naast IL-4 en GM-CSF andere adjuvanten en/of attractanten (zoals TLR liganden en BCG) met deze vaccins toegediend worden²².

Tevens kan de plaats van injectie hiermee worden voorbehandeld ²². Na opname van het antigeen en activatie door de adjuvanten, migreren de DC naar de lymfeklieren waar ze het antigeen presenteren en effector cellen (zoals T-cellen) kunnen activeren. Met een groeiend aantal geïdentificeerde DC subsets met bekende gespecialiseerde immunologische functies, wordt het mogelijk TGA gericht af te leveren bij DC populaties die TGA-specifieke T cel responsen met hoge efficiëntie kunnen induceren ²³. De verwachting is dat deze DC-gerichte vaccins in de toekomst breed toepasbaar zijn en kosten-effectief klinisch ingezet kunnen worden.

Optimaliseren van vaccins: combinatietherapieën

Naast de verschillende mogelijkheden om een klinisch vaccin te bereiden, worden er steeds nieuwe mogelijkheden en aangrijpingspunten gevonden om de effectiviteit van vaccins te optimaliseren. *In vitro* kunnen bij de bereiding van DC vaccins TLR-liganden worden gebruikt zoals LPS en R848, om zodoende de opname van het antigeen (lysaat of apoptotische cellen) te verhogen, alsmede de activatiestaat van de DC. Tevens is van verschillende anti-leukemie medicijnen bekend dat zij het immuunsysteem gunstig kunnen beïnvloeden. Zo leidt gebruik van HDAC inhibitors tot down-modulatie van CLIP, hetgeen de antigeenpresentatie verhoogt en de werking van een vaccin kan verbeteren (ongepubliceerde data).

Recente studies hebben aangetoond dat er middelen zijn die een direct cytotoxisch effect hebben op tumoren, maar tevens het immuunsysteem direct of indirect kunnen activeren, zoals RIG-1 liganden en Imatinib ²⁴. Bovendien kunnen klassieke cytostatica ook tot een immunogene celdood van tumoren leiden, resulterend in opname door geactiveerde DC en TGA-specifieke T-cel activatie ²⁵. Sommige cytostatica kunnen ook rechtstreeks verbeterde DC uitrijping en een pro-inflammatoire conditionering van het tumor milieu bewerkstelligen ^{15,26}. Deze observaties hebben geleid tot een hernieuwde interesse in gecombineerde immuno-chemotherapie, met mogelijk synergistische anti-tumor effecten.

Een van de grote doorbraken van het huidige immunotherapeutisch onderzoek bij solide tumoren, is het blokkeren van zogenaamde 'immuun checkpoint moleculen' op het oppervlakte van geactiveerde T-cellen, zoals CTLA-4 en PD-1²⁷. Immuun checkpoint moleculen voorkomen dat een immuunrespons ongecontroleerd kan voortduren. Tumoren misbruiken deze mechanismen om tumor-specifieke responsen te remmen. Door gebruik te maken van antilichamen die deze interacties blokkeren, krijgen tumor-specifieke effector T-cellen de kans uit te groeien en hun effectorfunctie te vervullen. Deze checkpoint blokkerende antilichamen kunnen ook worden gecombineerd met vaccinatie ²⁸. Uit gerandomiseerde fase 3 studies is gebleken, dat patiënten met een

gemetastaseerd melanoom die met antilichamen tegen CTLA-4 en/of PD-1 werden behandeld een gemiddeld twee maal langere overlevingsduur hadden dan patiënten die volgens de standaard therapie behandeld werden ^{29,30}. Tevens heeft een recente klinische studie uitgewezen dat de gecombineerde behandeling met CTLA-4 (Ipilimumab) en PD-1 (Nivolumab) een betere response lijkt te geven, alhoewel “overall survival” data ontbreken. Deze studie heeft aangetoond dat >50% van de uitbehandelde melanoom patiënten een objectieve respons te hebben, met een minimale tumorregressie van 80% ³¹. Vanwege het blokkeren van deze negatieve terugkoppelingseiwitten, hebben de behandelde patiënten een grotere kans op het krijgen van auto-immuun gerelateerde klachten, maar deze blijken in de klinische praktijk veelal goed te behandelen voor zowel de mono- als combinatietherapie ²⁹⁻³¹. Bij AML is de ervaring met CTLA-4 of PD-1 blokkade beperkt, maar de eerste klinische trials zijn inmiddels gestart met Ipilimumab (anti-CTLA-4) bij AML patiënten die refractair zijn voor behandeling of een recidief ervaren (clinicaltrial.gov: NCT01757639). Deze ontwikkelingen creëren tevens de mogelijkheid om DC vaccinatie te combineren met checkpoint blokkerende antilichamen en derhalve de klinische responsen te vergroten ³².

Timing van actieve en passieve immuuntherapie bij AML

Met flowcytometrische en moleculaire technieken kan steeds nauwkeuriger worden voorspeld wanneer een recidief optreedt ¹. Deze informatie omtrent MRD kan leidend zijn om het tijdstip waarop immuuntherapie wordt gestart te bepalen. Bij voorkeur wordt actieve immuuntherapie toegepast voordat een recidief wordt vastgesteld en na herstel van het immuunsysteem na de gegeven chemotherapie. De tijd die dit herstel vergt verschilt per patiënt, maar het is beschreven dat het CD8⁺ T-cel compartiment sneller herstelt dan het CD4⁺ T-cel compartiment.³³ Het verschil in herstel tussen deze compartimenten heeft waarschijnlijk te maken met een verminderde thymus functie na chemotherapie, die voor CD4⁺ T-cellen meer van belang is. Niettemin hebben wij gevonden dat inductie van TGA-specifieke CD8⁺ T-cellen gehinderd kan zijn tot langer dan 1.5 jaar na remissie, zoals beschreven in **hoofdstuk 6** voor de TGA WT-1 en PRAME ³⁴. Het B-cel compartiment is ongeveer 3 maanden na SCT hersteld qua aantallen ³³. Ook na SCT blijken de verschillende compartimenten verminderd te functioneren, maar deze waarnemingen zijn echter veelal binnen 6 maanden na SCT gedaan. De meeste recidieven treden echter binnen 1 à 1,5 jaar na het einde van behandeling op, dus in sommige gevallen voordat volledig immunologisch herstel is opgetreden. Een combinatie van passieve en actieve immuuntherapie ter overbrugging van het hematologisch herstel en/of effector cel functioneren is hierbij een optie, zoals adoptieve T-cel transfer of behandeling met tumor-specifieke antilichamen. Tevens wordt, in nu nog experimentele

setting, getracht het hematologisch herstel na SCT te bespoedigen, door bijvoorbeeld co-transplantatie van mesenchymale stam cellen³⁵. Indien een recidief optreedt na allogene SCT worden goede resultaten bereikt met donor lymfocyten infusie (DLI). De effectiviteit van een DLI kan worden vergroot door het te combineren met een vorm van actieve immuuntherapie, zoals DC vaccinatie. Of in deze setting checkpoint blokkerende antilichamen volledig veilig toegepast kunnen worden, is nog onzeker. Echter, in een kleinschalige studie is reeds aangetoond dat behandeling met Ipilimumab na allogene SCT niet per definitie tot een verhoging van GVHD leidt³⁶. Momenteel wordt dit voor o.a. AML patiënten grootschaliger getest in een fase I studie (clinicaltrial.gov: NCT01822509). De resultaten uit deze en de hierboven benoemde studies zijn van groot belang, omdat ze niet enkel bewijs kunnen leveren voor een verbetering in de overleving van AML patiënten, maar ook inzicht kunnen geven in de verminderde effectorfunctie van het immuunsysteem na chemotherapie en SCT en of deze (deels) opgeheven kan worden. Wanneer immuun checkpoint blokkade in AML veilig blijkt, zijn de deuren geopend voor hernieuwde klinische studies met gecombineerde DC- en andere cel-gebaseerde vaccins en zullen de grenzen voor de behandeling van AML worden verlegd.

Conclusie en toekomstperspectieven

Door het toenemend aantal successen bij solide tumoren, onze toenemende kennis van DC biologie en met de recente doorbraken omtrent checkpoint blokkade, is het veld van de immuuntherapie aan een opmars bezig. Er lijkt een consensus in het veld te worden bereikt dat *in vivo* toegediende vaccins gericht op belading en activatie van DC *in situ* de meest veelbelovende klinische toekomst hebben²³. De potentie van het blokkeren van CTLA-4 en PD-1 is reeds aangetoond voor solide tumoren en de eerste klinische trials voor het behandelen van AML patiënten met deze middelen zijn reeds gestart. Tot dusver zijn de experimentele therapieën bij AML veelal als monotherapie aangeboden, maar vanwege de vele modulerende mechanismen die leukemie cellen kunnen gebruiken om herkenning en eliminatie te voorkomen, is het noodzakelijk om actieve immuuntherapie als combinatietherapie aan te bieden. Voordat immuuntherapie in de vorm van vaccinaties haar entree zal maken als standaard (adjuvante) therapie, dienen een aantal centrale vragen te worden beantwoord, zoals de keuze van het type (of de typen) vaccin(s), het type adjuvant, het te kiezen behandelingsschema en het moment van toediening van het vaccin. Tenslotte moeten vergelijkende studies naar de verschillende DC bereidingsstrategieën worden uitgevoerd om te komen tot de meest optimale vaccinbereiding voor het voorkomen van een recidief van AML.

WAT IN DIT PROEFSCHRIFT WORDT BESCHREVEN – VOOR LEKEN

Met immuuntherapie wordt getracht het afweerweersysteem, of immuunsysteem, van kankerpatiënten op te leiden, om zodoende tumorcellen aan te vallen en op te ruimen, op een vergelijkbare manier waarop bijvoorbeeld bacteriën of virussen worden opgeruimd. In dit proefschrift hebben we getracht een immuunrespons op te wekken tegen acute myeloïde leukemie (AML); een kanker die ontstaat uit de stamcellen, of vroege voorloper cellen, die normaliter uitrijpen tot de myeloïde witte bloedcellen, ook wel de cellen van onze aangeboren afweer genoemd. Tot deze myeloïde cellen behoren bijvoorbeeld de dendritische cellen (zie verder), maar ook vele andere cellen, elk met specifieke functies. Doordat de kankercellen bij AML patiënten nou juist ontspoorde cellen van het immuunsysteem zijn en ze daarmee de juiste werking van het immuunsysteem zeer nadelig beïnvloeden, is het vrijwel onmogelijk immuuntherapie toe te passen ten tijde van actieve ziekte. Echter, na chemotherapie en mogelijk stamcel transplantatie herstelt het immuunsysteem (en dus ook de ziekte) zich tijdelijk en soms langdurig. Gedurende deze periode van herstel is er ruimte om immuuntherapie toe te passen en AML cellen die niet door de eerdere therapieën zijn gedood (zogenaamde restziekte) alsnog te elimineren. Dit klinkt relatief eenvoudig, maar doordat tumorcellen ontspoorde normale cellen zijn, hebben ze veel vergelijkbare kenmerken met hun gezonde “voorlopers”. Hierdoor zijn kankercellen voor het immuunsysteem niet altijd duidelijk herkenbaar als afwijkend en worden daardoor niet adequaat opgeruimd. Daarnaast hebben sommige kankercellen mechanismen ontwikkeld waarmee ze herkenning of uitschakeling door het immuunsysteem kunnen voorkomen. Om het immuunsysteem op te leiden om de tumor aan te vallen, is het zaak dit op de meest optimale manier te doen en zodoende de meest effectieve anti-kanker respons op te wekken.

Ons immuunsysteem bestaat uit verschillende witte bloedcellen, elk met een specifieke functie. Om een anti-kanker respons op te wekken, maken we in dit proefschrift gebruik van dendritische cellen. Dendritische cellen hebben in ons lichaam de taak hun omgeving te patrouilleren, op zoek naar afwijkende en potentieel gevaarlijke structuren, bijvoorbeeld bacteriën, geïnfecteerde cellen, en dus ook dode tumor cellen. Eiwitten afkomstig van indringers zoals microben of tumorcellen die door het afweersysteem worden herkend worden antigenen genoemd. Dendritische cellen kunnen deze antigenen opnemen (fagocyteren) en vervolgens geactiveerd worden. Kleine fragmenten van de gefagocyteerde antigenen worden door dendritische cellen gepresenteerd aan andere witte bloedcellen, de zogenaamde T-cellen. Ondanks dat een ieder van ons miljoenen T-cellen heeft, herkent één T-cel slechts één specifiek antigeen en er is hierdoor slechts een zeer klein aantal T-cellen die het antigeen herkent dat door de dendritische cellen wordt gepresenteerd. Echter, wanneer dendritische cellen

op de juiste manier worden geactiveerd, kunnen zij op hun beurt T-cellen activeren die vervolgens veelvuldig delen, waarbij elke gedeelde T-cel hetzelfde antigeen herkent. Op deze wijze kan een heel leger aan T-cellen gecreëerd worden dat een hetzelfde antigeen herkent en het is deze afweerreactie die we in de studies beschreven in dit proefschrift gebruiken om een leger te creëren dat de kankercellen herkent en aanvalt.

De focus lag in dit proefschrift op de vorm waarin we van AML afkomstige antigenen aanbieden aan dendritische cellen. Dode kankercellen zijn in meerdere studies gebruikt als bron van antigeen, maar hier hebben we zeer kleine bolletjes gebruikt die uitgescheiden worden door alle cellen die een geprogrammeerde vorm van zelfmoord, genaamd apoptose, ondergaan. Deze bolletjes, of apoptotische blebs, zijn niet eerder specifiek getest als bron van antigeen voor immuuntherapeutische doeleinden. Uit onze studie is gebleken dat wanneer we deze blebs in het laboratorium aanbieden aan dendritische cellen, er veel betere T-cel deling en activatie optrad. Verder bleken verschillende soorten dendritische cellen, zo ook bepaalde populaties in de huid, een voorkeur te hebben voor het fagocyteren van deze blebs en daarna beter in staat waren T-cellen te activeren. Zo wijzen de resultaten verkregen uit ons onderzoek op de mogelijkheid om eenvoudig via injectie van AML blebs in de huid, patiënten effectief te vaccineren tegen hun eigen leukemie.

Ondanks dat er nog een lange weg te gaan is, dragen de resultaten beschreven in dit proefschrift zo bij aan het verbeteren van de huidige dendritische cel-gebaseerde immuuntherapeutische benaderingen.

REFERENTIELIJST

1. Houtenbos I, Westers TM, Stam AGM, et al. Serum-free generation of antigen presenting cells from acute myeloid leukaemic blasts for active specific immunisation. *Cancer Immunol. Immunother.* 2003;52(7):455–62.
2. Breems DA, Van Putten WLJ, Huijgens PC, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(9):1969–78.
3. Van Luijn MM, van den Ancker W, Chamuleau MED, et al. Absence of class II-associated invariant chain peptide on leukemic blasts of patients promotes activation of autologous leukemia-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res.* 2011;71(7):2507–17.
4. Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature.* 2012;490(7420):412–6.
5. Chamuleau MED, van de Loosdrecht A a, Hess CJ, et al. High INDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome. *Haematologica.* 2008;93(1592-8721 (Electronic)):1894–1898.
6. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(10):715–27.
7. Kim Y-J, Cho S-G, Lee S, et al. Potential role of adoptively transferred allogeneic WT1-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes for the sustained remission of refractory AML. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(3):597–9.
8. Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2011;118(12):3273–9.
9. Grupp S a, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(16):1509–18.
10. Westers TM, Van Den Ancker W, Bontkes HJ, et al. Chronic myeloid leukemia lysate-loaded dendritic cells induce T-cell responses towards leukemia progenitor cells. *Immunotherapy.* 2011;3(4):569–576.
11. Ruben JM, van den Ancker W, Bontkes HJ, et al. Apoptotic blebs from leukemic cells as a preferred source of tumor-associated antigen for dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014;
12. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 1995;57:289–300.
13. Houtenbos I, Westers TM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Leukemia-derived dendritic cells: towards clinical vaccination protocols in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2006;91(3):348–55.
14. Masterson AJ, Sombroek CC, De Gruijl TD, et al. MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood.* 2002;100(2):701–3.
15. Van de Ven R, Reurs AW, Wijnands PGJT, et al. Exposure of CD34+ precursors to cytostatic anthraquinone-derivatives induces rapid dendritic cell differentiation: implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012;61(2):181–91.
16. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 2004;199(6):815–824.
17. Tacke PJ, de Vries IJM, Gijzen K, et al. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood.* 2005;106(4):1278–85.
18. Hangalapura BN, Timares L, Oosterhoff D, et al. CD40-targeted adenoviral cancer vaccines: the long and winding road to the clinic. *J. Gene Med.* 2012;14(6):416–27.
19. Oosterhoff D, Sluijter BJR, Hangalapura BN, de Gruijl TD. The dermis as a portal for dendritic cell-targeted immunotherapy of cutaneous melanoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012;351:181–220.
20. Lindenberg JJ, Oosterhoff D, Sombroek CC, et al. IL-10 conditioning of human skin affects the distribution of migratory dendritic cell subsets and functional T cell differentiation. *PLoS One.* 2013;8(7):e70237.
21. Santegoets SJ a M, Bontkes HJ, Stam AGM, et al. Inducing antitumor T cell immunity: comparative functional analysis of interstitial versus Langerhans dendritic cells in a human cell line model. *J. Immunol.* 2008;180(7):4540–9.

22. Tripp CH, Ebner S, Ratzinger G, Romani N, Stoitzner P. Conditioning of the injection site with CpG enhances the migration of adoptively transferred dendritic cells and endogenous CD8+ T-cell responses. *J. Immunother.* 2009;119(8):2127–30.
23. Kreutz M, Tacken PJ, Figdor CG. Targeting dendritic cells--why bother? *Blood.* 2013;121(15):2836–44.
24. Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *J. Clin. Invest.* 2009;119(8):2127–30.
25. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012;11(3):215–33.
26. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, et al. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 2013;38(4):729–41.
27. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(2):122–33.
28. Van Den Eertwegh AJM, Versluis J, Van Den Berg HP, et al. Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(5):509–17.
29. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(8):711–23.
30. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(26):2455–65.
31. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(2):122–33.
32. Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *Br. J. Haematol.* 2013;162(3):313–25.
33. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune Reconstitution and Immunotherapy After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood.* 1998;92(5):1471–1490.
34. Van den Ancker W, Ruben JM, Westers TM, et al. Priming of PRAME- and WT1-specific CD8(+) T cells in healthy donors but not in AML patients in complete remission: Implications for immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2013;2(4):e23971.
35. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood.* 2010;115(19):3861–8.
36. Bashey A, Medina B, Corringham S, et al. CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2009;113(7):1581–8.